

生体中のリゾホスファチジルセリンの測定およびリゾホスファチジルセリン受容体の機能解析

著者	奥平 倫世
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬博第530号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00121802

「生体中のリゾホスファチジルセリンの測定および

リゾホスファチジルセリン受容体の機能解析」

分子細胞生化学分野 奥平 倫世

【背景と目的】

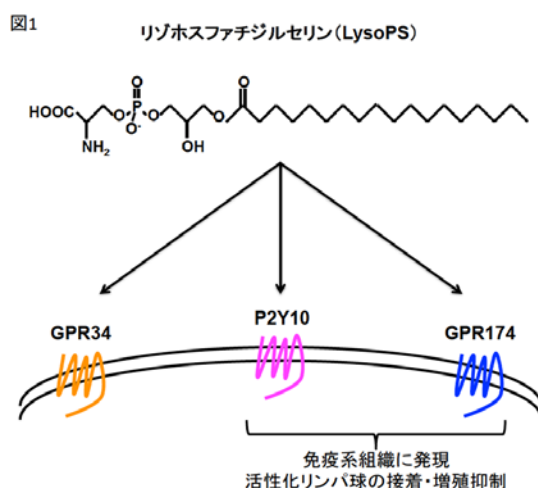
リゾリン脂質はグリセロール骨格またはスフィンゴシン骨格に極性頭部と一本の脂肪酸を有する単純な構造の脂質の総称である。中でも、リゾホスファチジン酸（LPA）やスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）に関しては産生酵素、特異的な受容体が同定され、それら分子のノックアウト（KO）マウス、遺伝病などの解析から、個体レベルで生理的・病的に重要な役割を持つことが明らかになっている。

リゾホスファチジルセリン（LysoPS）は極性頭部にアミノ酸のセリンを有するリゾリン脂質である（[図 1](#)）。LysoPS は *in vitro* においてマスト細胞の脱顆粒促進、T 細胞の増殖抑制などいくつかの作用を示すことから、LPA や S1P に次ぐ第 3 のリゾリン脂質メディエーターとして期待されているが、「生体内での存在」、「産生機構」、「受容体」がほとんど未解明であったため、メディエーターとして機能するかについて

については不明であった。しかし近年、当研究室によりオーファン GPCR であった P2Y10、GPR174 が LysoPS に特異的な応答性を示すことが明らかになった。これらの受容体は脾臓やリンパ節などの免疫組織に局限して発現しており、また単離リンパ球を用いた *in vitro* の解析から LysoPS が P2Y10 や GPR174 を介して活性化リンパ球の接着や増殖を抑制することが分かっている。従って、LysoPS が生体内においても免疫系に作用する可能性が強く示唆されている（[図 1](#)）。

一方で、LysoPS そのものが生体内のどこにどのような状況で存在するのかについてはほとんど明らかになっていない。LysoPS がメディエーターであることを証明する上で、LysoPS 分子そのものを捉えることは極めて重要である。そこで私は、LysoPS の検出系を構築し、生体試料中の LysoPS の測定を行うこととした。この研究の過程で、LysoPS と類似の構造・作用を有するリゾホスファチジルスレオニン（LysoPT）を初めて検出することに成功したため、同時に報告する。

次に、LysoPS 受容体 KO マウスを用いて自己免疫疾患における LysoPS 受容体の機



能解析を行った。

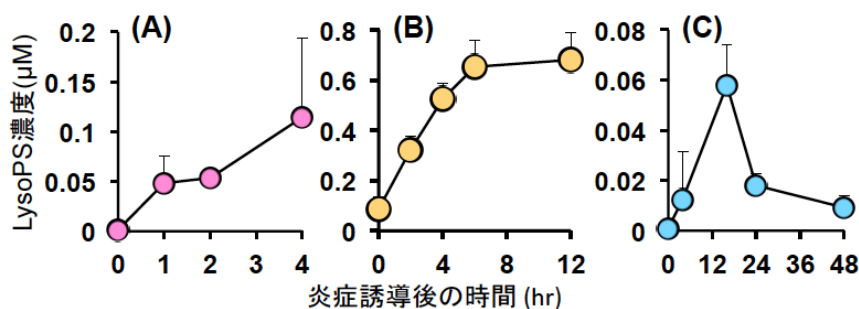
【LysoPS および LysoPT の測定】

LysoPT について : LysoPT は LysoPS 受容体同定を目的として、LysoPS のマスト細胞脱顆粒促進作用に着目して合成された LysoPS 誘導体である。LysoPT は極性頭部にアミノ酸のスレオニンを含んでおり、LysoPS とはメチル基の有無が異なるだけの極めて類似した構造をしているが、マスト細胞に対する活性は LysoPS の 10-20 倍高い。LysoPT は既知の LysoPS 受容体（図 1）には作用しないが、マスト細胞上の未知の LysoPS 受容体を介して作用している可能性がある。

方法と結果 : LysoPS および LysoPT の検出・定量には液体クロマトグラフィー/トリプル四重極型質量分析計（LC-MS/MS）を用いた。既存の測定系の検出感度では血漿中の LysoPS を測定できなかったため、まず系の改良を行った。MS のイオン源から検出器へのイオン導入効率を上昇させることにより既存系から約 20 倍の高感度化に成功し、定量限界が 500 pM と極めて感度の高い定量系を構築することができた。

新規定量系を用いた測定の結果、マウスの血漿中には 10-20 nM の LysoPS が存在することが分かった。さらに、創傷や腹膜炎、肝炎などの炎症を誘導すると、炎症局所で LysoPS が顕著に増加することが明らかとなった（図 2）。興味深いことに LysoPS の脂肪酸分子種の分布は炎症ごとに異なっており、創傷では不飽和脂肪酸が、腹膜炎では飽和脂肪酸が、肝炎では飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸のいずれもが豊富に検出された。

図2



炎症局所にLysoPSが豊富に存在する

(A) 創傷部浸出液、(B) 肝炎の血液、(C) 腹膜炎の腹腔洗浄液

一方、LysoPT は血漿中からは検出できなかったが、組織中には存在しており特に胃や小腸などの消化器系臓器に豊富に存在することが分かった。存在量は LysoPS の約 1/200 であったが、その臓器分布は LysoPS と極めて類似していた。

考察：本研究により、LysoPS が炎症時に増加することが初めて明らかになった。また、有機合成化合物であると考えられていた LysoPT が生体内に存在することが初めて明らかになった。

LysoPS は脂肪酸を 2 本有するリン脂質であるホスファチジルセリン (PS) からホスホリパーゼ A₁ (PLA₁) または PLA₂ により脂肪酸が切断されて産生されることが考えられている。一般に PLA₁ により不飽和脂肪酸型 LysoPS が、PLA₂ により飽和脂肪酸型 LysoPS が産生される。従って、炎症時の脂肪酸分子種の分布から、創傷では PLA₁ が、腹膜炎では PLA₂ が、肝炎では PLA₁・PLA₂ の両方が LysoPS の産生に寄与していると考えられる。また LysoPS 受容体である GPR34 はマクロファージに、P2Y₁₀ および GPR174 はリンパ球に発現が見られることから、炎症時に上昇した LysoPS がこれらの受容体を介して炎症を制御している可能性が示唆される。

LysoPT は LysoPS よりも活性は 10-20 倍高いが、存在量は約 1/200 であることから生体内におけるマスト細胞への作用は主に LysoPS が担っていると考えられる。一方、臓器分布が極めて類似していることから、同様の産生経路、ホスファチジルスレオニン (PT) から PLA₁ または PLA₂ により産生される経路が想定される。通常の細胞膜において PT は PS に比べて極めて少ないが、セリン欠乏培地で培養した細胞においては PS の代わりに PT が合成されることが報告されている。従って、セリンが合成できないような環境にある細胞においては LysoPS の代わりに LysoPT が産生され、機能する可能性はあると考えられる。本研究により今後の LysoPT の産生酵素や受容体、生体内の機能の解明が期待される。

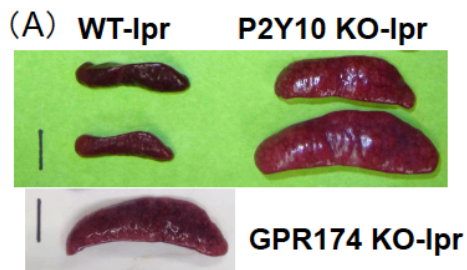
【LysoPS 受容体 KO マウスの解析】

方法と結果： *in vitro* の解析から、LysoPS 受容体である P2Y₁₀ および GPR174 がリンパ球の増殖・活性化を抑制することが分かっている。そこで本研究では、*in vivo* でも P2Y₁₀・GPR174 がリンパ球を抑制するのかを調べるために、リンパ球異常増殖症モデルマウス（以下、lpr マウス）を用いた解析を行った。P2Y₁₀ KO マウスおよび GPR174 KO マウスと lpr マウスを交配させ、それぞれの受容体 KO-lpr マウスを作製してその病態評価を行った。

その結果、KO-lpr マウスは野生型 (WT) -lpr マウスと比較して、血中リンパ球数および脾臓・リンパ節の肥大化が 2-3 倍に亢進していることが分かった (図 3)。また、フローサイトメーターを用いてリンパ球ポピュレーションの解析を行ったところ、KO-lpr マウスにおいて、ダブルネガティブ T (DNT) 細胞が有意に増加していることが分かった。一方、B 細胞、T 細胞の数は WT-lpr マウスと KO-lpr マウスで差は見られなかった。

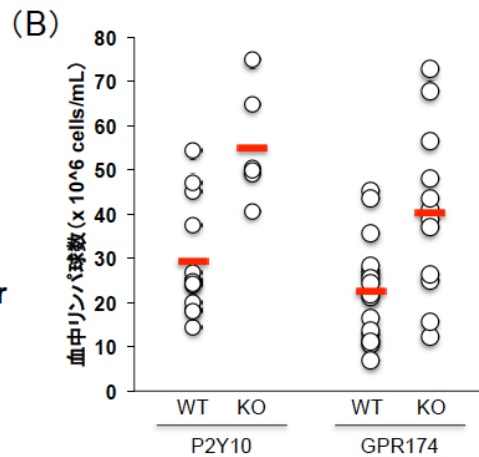
また、LC-MS/MS による lpr マウス血漿中の LysoPS を測定したが、LysoPS 量の増加は認められなかった。

図3



(A)脾臓写真

(B)血中リンパ球数



考察：本研究から、lpr マウスにおいて P2Y10・GPR174 が DNT 細胞の数を負に制御することで、免疫組織の肥大化を抑制することが明らかになった。作用メカニズムとしては DNT 細胞の増殖抑制または細胞死促進の 2 つが考えられるが、LysoPS が *in viro* において活性化リンパ球の増殖を抑制することから、*in vivo* でも DNT 細胞の増殖を抑制する可能性が示唆される。DNT 細胞は lpr マウスで見られる特異的なリンパ球亜集団であり、通常のマウスにはほとんど存在しない。今後、T 細胞や B 細胞が増加するような免疫疾患モデルを用いて、P2Y10 や GPR174 が同様の機能を有しているのか解析する必要がある。今回は血漿中の LysoPS 量の増加は見られなかったことから、LysoPS が P2Y10 や GPR174 のリガンドとして機能しているかは分からなかった。先に行った研究で LysoPS が炎症局所で産生されることが分かっている。従って lpr マウスにおいても DNT 細胞が増殖する場（脾臓やリンパ節）に限局して LysoPS が産生されている可能性があり、今後 LysoPS の局在解析が必要であると考ええる。

【まとめ】

本研究により①LysoPS の詳細な測定が可能になり、②LysoPS 受容体が *in vivo* でリンパ球の数を負に制御することが初めて明らかとなった。LysoPS はこれまでメディエーターとして機能するかどうか不明であったが、本研究は今後 LysoPS の産生系や機能を解明する上で非常に重要な結果となると考えられる。

論文提出者：奥平 倫世

論文審査委員（主査）：松沢 厚

論文題目：生体中のリゾホスファチジルセリンの測定および
リゾホスファチジルセリン受容体の機能解析

リゾホスファチジルセリン（LysoPS）は極性頭部にアミノ酸のセリンを有するリゾリン脂質であり、これまでにマスト細胞の脱顆粒促進など、*in vitro*においていくつかの作用を示すことが知られていた。しかし、「生体内での存在」、「産生機構」、「受容体」がほとんど未解明であったため、メディエーターとして機能するかについては不明であった。近年、オーファン GPCR であった P2Y₁₀、GPR174 が LysoPS に特異的な応答性を示すことが明らかになった。これらの受容体は脾臓やリンパ節などの免疫組織に局限して発現しており、また単離リンパ球を用いた *in vitro* の解析から LysoPS が P2Y₁₀ や GPR174 を介して活性化リンパ球の接着や増殖を抑制することが分かっている。従って、LysoPS が生体内においても免疫系に作用する可能性が強く示唆されている。一方で、LysoPS そのものが生体内のどこにどのような状況で存在するのかについてはほとんど明らかになっていない。本研究では、LysoPS の検出系を構築し、生体中の LysoPS の測定を行った。同時に、LysoPS と類似の構造・作用を有するリゾホスファチジルスレオニン（LysoPT）の検出も試みた。次に、LysoPS 受容体ノックアウト (KO) マウスを用いて自己免疫疾患における LysoPS 受容体の機能解析を行った。

まず、LC-MS/MS を用いた LysoPS および LysoPT の測定系を構築した。MS のイオン源から検出器へのイオン導入効率を上昇させることにより既存系から約 20 倍の高感度化に成功した。測定の結果、マウスの血漿中に約 40 nM の LysoPS が存在すること、また創傷や腹膜炎、肝炎などの炎症を誘導すると、炎症局所で LysoPS が顕著に増加することが明らかとなった。一方、LysoPT は血漿中からは検出できなかったが、組織中には存在しており特に胃や小腸などの消化器系臓器に豊富に存在することが分かった。存在量は LysoPS の約 1/200 であったが、その臓器分布は LysoPS と極めて類似していた。本研究により、LysoPS が炎症時に増加すること、また LysoPT が生体内に存在することが初めて明らかになった。この結果は LysoPS および LysoPT がメディエーターとして機能することを強く示唆している。新規定量系を用いることで、今後 LysoPS および LysoPT の産生機構や作用機構の解明が期待される。

次に、LysoPS 受容体 (P2Y₁₀ および GPR174) に着目した解析を行った。*in vivo* でも P2Y₁₀・GPR174 がリンパ球を抑制するのかを調べるために、リンパ球異常増殖症モデルマウス (lpr マウス) を用いた解析を行った。その結果、KO-lpr マウスにおいて血中リンパ球数および脾臓・リンパ節の肥大化が 2-3 倍に亢進していることが分かった。また、フローサイトメーターを用いてリンパ球ポピュレーションの解析を行ったところ、KO-lpr マウスにおいてダブルネガティブ T (DNT) 細胞が増加していることが分かった。本研究から、lpr マウスにおいて P2Y₁₀・GPR174 が DNT 細胞の数を負に制御することで、免疫組織の肥大化を抑制することが明らかになった。この結果は LysoPS 受容体の *in vivo* における機能を初めて明らかにしたものであり、T 細胞や B 細胞など LysoPS 受容体の発現が見られる他の免疫細胞においても、同様の機能を発揮している可能性が期待される。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。